

41287

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 766 193

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

97 09185

⑤1 Int Cl⁶ : C 07 K 19/00, C 07 K 14/25, A 61 K 39/112, 48/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 18.07.97.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 22.01.99 Bulletin 99/03.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT CURIE — FR et CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CNRS — FR.

⑦2 Inventeur(s) : GOUD BRUNO et JOHANNES LUD-
GER.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : ERNEST GUTMANN YVES PLASSE-
RAUD SA.

⑤4 POLYPEPTIDE CHIMÉRIQUE COMPRENANT LE FRAGMENT B DE LA TOXINE SHIGA ET DES PEPTIDES
D'INTERET THERAPEUTIQUE.

⑤7 L'invention se rapporte à une séquence polypeptidi-
que comprenant le fragment B de la toxine de Shiga ou un
équivalent fonctionnel de celui-ci liée à l'extrémité carboxy-
terminale à un ou plusieurs polypeptides répondant à la for-
mule B - X dans laquelle B représente le fragment B de la
toxine de Shiga et X représente un ou plusieurs polypepti-
des d'intérêt thérapeutique, et son utilisation comme princi-
pe actif d'une composition thérapeutique.

FR 2 766 193 - A1



L'invention a pour objet des moyens et leur utilisation pour le transport intracellulaire des protéines ou polypeptides ainsi que la présentation membranaire de certains épitopes.

Le transport rétrograde peut être défini comme le cheminement
5 des molécules de la membrane cellulaire vers le réticulum endoplasmique (RE), en passant le cas échéant par l'appareil de Golgi. Ce mécanisme a été mis en évidence pour certaines classes de protéines du réticulum endoplasmique porteuses du térapeptide KDEL à leur extrémité carboxy-terminale (ou HDEL dans la levure). Tant des évidences biochimiques que
10 morphologiques indiquent que ces protéines quittent le réticulum endoplasmique, atteignent l'appareil de Golgi dans lequel elles subissent des modifications dans leur chaîne carbohydate puis sont redirigées vers le réticulum endoplasmique. Le térapeptide KDEL est un signal de rétention qui permet de piéger le peptide ou la protéine à laquelle il est
15 attaché dans le réticulum endoplasmique, ce piégeage ayant lieu par interaction à une protéine récepteur de ce motif KDEL décrit par Lewis M.J. et al dans Nature, 348 (6297) : 162 : 3, 1990 November 8.

D'autres évidences sur l'existence d'un transport rétrograde intracellulaire viennent de l'étude de certaines toxines bactériennes qui
20 entrent dans le cytosol des cellules eucaryotes après passage dans le réticulum endoplasmique (Pelham et al. (1992) Trends cell. Biol., 2 : 183-185). Un exemple particulièrement étudié est celui de la toxine de Shiga de *Shigella dysenteriae*, ainsi que les toxines de type Shiga de *E. coli*. Ces toxines sont composées de deux chaînes polypeptidiques, l'une (le
25 fragment A) est le fragment toxique et porte une activité déadénylase qui inhibe la synthèse protéique par action sur l'ARN ribosomal 28S, alors que l'autre sous-unité (fragment B) permet le couplage de la toxine sur sa cible (O'Brien et al (1992), Curr. Top. Microbiol. Immunol. 180: 65-94). Des études en microscopie électronique ont montré que la toxine de Shiga peut

être détectée dans le RE des cellules A 431, Vero, des cellules Daudi notamment (Sandvig et al, 1992 et 1994 ; KHINE, 1994). En outre, le traitement des cellules avec un métabolite fongique qui provoque la perte de la structure de l'appareil de Golgi (brefeldine A) protège les cellules
5 contre la toxine de Shiga suggérant ainsi qu'elles traversent l'appareil de Golgi avant d'atteindre le RE. Kim et al (1996) ont enfin confirmé que le fragment B de la toxine est localisée dans l'appareil de Golgi.

L'état des connaissances sur le transport rétrograde, et notamment le transport du fragment B de la toxine Shiga dans le RE est
10 donnée dans les références suivantes : Sandvig et al (1992) Nature 358 :510-512 ; Sandvig et al (1994) J. Cell. Biol 126 :53-64 ; Kim et al, (1996) J. Cell. Biol 134 :1387-1399.

Le transport intracellulaire est défini comme l'ensemble des échanges entre les différents compartiments cellulaires.

15 Les auteurs de la présente demande ont observé que le fragment B était acheminé non seulement vers le RE, mais aussi dans le noyau de cellules des lignées hématopoïétique notamment les cellules dendritiques et les macrophages.

Les auteurs ont montré que ces cellules, incubées en présence
20 de deux micro-molaires du fragment B-gly-KDEL tel que décrit ci-dessous pendant trois heures puis fixées présentaient une réactivité avec des anticorps spécifiques contre la toxine dans le noyau et même dans le nucléole de ces cellules (résultats non publiés), ce qui indique bien l'existence d'un transport intracellulaire dudit fragment.

25 La présente invention résulte des observations sur le transport intracellulaire du fragment B de la toxine de Shiga (le Fragment B) et utilise ses propriétés d'acheminement pour construire une séquence polypeptidique chimérique contenant :

- soit un peptide ou polypeptide d'intérêt thérapeutique lié à ce

fragment ou tout équivalent fonctionnel de celui-ci.

- soit une polynucléotide portant une séquence dont l'expression est recherchée. Le couplage entre le fragment B et la séquence polynucléotidique est réalisée par toute technique connue de l'homme du métier et notamment celle décrite par Allinquant B. et al dans Journal of Cell Biology, 1288 (5) : 919-27, (1995).

Par équivalent fonctionnel, on entend toute séquence dérivée du Fragment B par mutation, délétion ou addition, et présentant les mêmes propriétés d'acheminement que le Fragment B .

- De façon élargie, un équivalent fonctionnel peut être constitué par tout fragment présentant les propriétés de transport rétrograde et même de transport intracellulaire jusqu'au noyau que celles décrites pour le Fragment B. A titre d'exemple, on peut citer le Fragment B de la verotoxine décrit dans Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84 (13) : 4364-8, 1987 July, ou le Fragment B de la ricine décrit par Lamb F.I. et al dans European Journal of Biochemistry, 148 (2) : 265-70, (1995). Après description des propriétés particulières de transport de ces fragments, l'homme du métier saura choisir le fragment qui sera le meilleur candidat comme vecteur d'acheminement d'une séquence quelconque dans un compartiment cellulaire quelconque.

- La présente invention a pour objet des séquences polypeptidiques chimériques, lesdites séquences comprenant au moins : le fragment B de la toxine de Shiga ou un équivalent fonctionnel de celui-ci à laquelle est liée à l'extrémité carboxy-terminale un ou plusieurs polypeptides X, répondant à la formule suivante :

B - X, dans laquelle :

- B représente le fragment B d'une toxine comme celle de Shiga, dont la séquence est décrite dans N. G. Seidah et al, (1986) J. Biol. Chem. 261 : 13928-31, et dans Strockbine et al (1988) J. Bact. 170 : 1116-22, ou un

équivalent fonctionnel de celle-ci, ou de verotoxine ou de ricine (références supra).

-X représente un ou plusieurs polypeptides dont la longueur totale a comme limite supérieure celle de la compatibilité avec un transport
5 rétrograde ou intracellulaire.

La présente invention porte également sur des molécules chimériques de structure

B - X'

dans lesquelles B a la même signification que ci-dessus et X'
10 représente une séquence nucléotidique codant une séquence peptidique X dont l'expression est recherchée, notamment un épitope d'antigène.

Les molécules chimériques de l'invention peuvent en outre comporter :

a) des sites de modification, tels un site de N- glycosylation constitué
15 d'environ 20 acides aminés, des sites de phosphorylation ou toute séquence nécessaire à une éventuelle maturation de la molécule.

b) un signal de rétention de type du tétrapeptide KDEL(Lys-Asp-Glu-Leu) qui, quand il est lié à l'extrémité carboxy-terminale des protéines résidentes du RE, entraîne une rétention après la maturation des protéines
20 par passage dans l'appareil de Golgi. Une synthèse sur le rôle du signal de rétention dans la maturation protéique est proposée dans M. J. Lewis et al, (1992) Cell, 68:353-64.

De façon plus générale, les séquences polypeptidiques chimériques pourront comprendre :

25 - toute séquence nécessaire à la maturation de la protéine dans un système cellulaire adapté ;

- toute séquence nécessaire à la reconnaissance d'un type cellulaire donné par la molécule chimérique, permettant ainsi une sélectivité d'action et de pénétration dans le cytoplasme de la cellule.

Le point commun à toutes les séquences de structure B - X ou B - X' chimériques est qu'elles contiennent le fragment B, ou un équivalent fonctionnel de celui-ci.

Les molécules chimériques de l'invention permettent un
5 acheminement des séquences X ou du produit d'expression de X' dans le RE. Quand X est lié au Fragment B, le transport rétrograde passe également par l'appareil de Golgi et probablement par les endosomes. En outre, dans certaines conditions, les molécules de l'invention peuvent subir une maturation conduisant à une présentation membranaire de certains
10 épitopes contenus dans la séquence polypeptidique chimérique.

Par maturation, on entend tout processus qui, à partir d'un polypeptide donné, conduit à l'émergence de peptides qui, eux-mêmes, pourront être présentés dans un compartiment cellulaire y compris le cytoplasme. La maturation peut être effectuée, soit par coupure
15 enzymatique dans le réticulum endoplasmique, soit par transport dans le cytoplasme dans lequel le polypeptide subit un clivage puis les peptides ainsi obtenus sont transportés à nouveau dans le réticulum endoplasmique.

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de
20 classe I (CMH cl I) peuvent se charger des molécules polypeptidiques d'intérêt X ou X' après un tel clivage et être présentées sur les membranes cellulaires.

Quand la molécule chimérique de l'invention consiste en un couplage d'un fragment B de son équivalent avec une molécule
25 polynucléotidique ou un vecteur d'expression comportant une séquence dont l'expression est recherchée, le polypeptide ainsi synthétisé, après transcription dans le noyau puis traduction dans le cytoplasme, pourra subir les mêmes étapes de clivage, maturation et transport intracellulaire que ce qui est décrit ci-dessus pour une séquence chimérique

polypeptidique.

Des molécules polypeptidiques chimériques conformes à l'invention peuvent constituer un principe actif dans une composition thérapeutique pour l'immunothérapie par un mécanisme qui se rapproche
 5 des processus biologiques quant à la présentation antigénique appropriée au développement de la réaction immune. Le fragment X représente alors un ou plusieurs épitopes dont la présentation membranaire est recherchée à la surface des cellules. La taille du fragment X est limitée uniquement par la capacité de transit intracellulaire des molécules chimériques concernées.

10 Cette approche peut être envisagée tant pour une immunothérapie anti-infectieuse ou anti-cancéreuse que pour constituer un leurre antigénique dans certaines maladies auto-immunes.

Tout type d'antigènes présentés par des CMH de I est un bon candidat pour sélectionner des épitopes simples ou chimériques qui font
 15 partie des constructions de l'invention. A titre d'exemple nous citerons :

a) Epitopes humains dérivés de protéines de cellules de mélanome :

- BAGE issu de la Tyrosinase (Boel, P. et al (1995), Immunity 2,
 20 167-75) ;

- GAGE issu de la gp75 (Van den Eynde, B. et al (1995), J. Exp. Med. 182, 689-98) ;

- Tyrosinase (Brichard V. et al (1993), J. Exp. Med. 178, 489-95)

- p15 issu de la Melan A/MART-1 (Coulie P.G. et al (1994),
 25 J. Exp. Med. 180, 35-42 ; Kawakami Y. et al. (1994), J. Exp. Med. 180, 347-52) ;

- MAGE-1 et -3 issus de la β -caténine (De Plaen E. et al (1994), Immunogenetics 40, 369-9 ; Traversari C et al (1992), J. Exp. Med. 176, 1453-7).

b) Epitopes humains dérivés de protéines de virus impliqués dans le développement du cancer :

- Peptides dérivés des protéines E6 et E7 du HPV 16 (Feltkamp M.C. et al (1993), Eur. J. Immunol. 23, 2242-9 ; Davis H.L. et al (1995), Hum
5 Gene Ther 6, 1447-56) ;

- Peptides dérivés de la protéine Hbs du HBV (Rehermann B. et al (1995), J. Exp. Med. 181, 1047-58) ;

- Peptides dérivés des protéines du EBV (Murray R.J. et al (1992), J. Exp. Med. 176, 157-68) ;

10 - Peptide dérivé du cytomégalovirus

c) Epitopes humains dérivés d'oncogènes :

- p21ras (Peace D.J. (1993), J. Immunother 14, 110-4 ; Ciernik, I.F. et al (1995) Hybridoma 14, 139-42) ;

- p53 (Gnjatic S. (1995), Eur. J. Immunol. 25, 1638-42)

15 d) Epitopes présentant un intérêt pour les maladies autoimmunes :

Ces épitopes peuvent être choisis parmi ceux décrits par Chiez R.M. et al (1994) dans Immunol. Today 15, 155-60.

e) Epitopes présentant un intérêt dans le contexte des maladies
20 infectieuses :

A titre d'exemple de tels épitopes, on peut citer ceux décrits par Furukawa K. et al (1994) dans J. Clin. Invest. 94, 1830-9.

Dans les constructions de l'invention, X ou le produit d'expression de X' peut également représenter une séquence
25 polypeptidique permettant la restauration d'une fonction du transport intracellulaire perturbée par quelque cause que ce soit. A titre d'exemple, une molécule biologique peut être piégée dans le RE du fait d'une modification par mutation, délétion ou addition d'une séquence, ayant pour effet de bloquer la maturation ou le transit de cette molécule. C'est le cas,

par exemple, du mutant CFTR (Δ F508) dont la liaison à une molécule chaperonne, telle la calnexine, est modifiée de telle manière que son relargage est empêché ou retardé, empêchant ainsi le transit intracellulaire. Cette mutation est la cause de la mucoviscidose. L'introduction dans le

5 réticulum endoplasmique d'une réplique non mutée pourrait permettre de déplacer les chaîne N-glycosylées de la glycoprotéine CFTR (Δ F508) du site d'interaction avec la calnexine, ayant pour effet de permettre à nouveau le transport de la protéine jusqu'à la membrane plasmique, et un fonctionnement normal des cellules épithéliales du poumon.

10 L'invention porte également sur des constructions d'acides nucléiques, et en particulier d'ADN ou d'ADNc comprenant une séquence de nucléotides codant pour la protéine chimérique dont la structure et ses différentes variantes sont définies ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention porte sur des vecteurs d'expression ou plasmides porteurs des

15 constructions ci-dessus et susceptible de les exprimer dans des cultures bactériennes. A titre d'exemple, le vecteur d'expression peut être le plasmide pSU108 décrit dans G. F. Su et al, (1992) Infect. Immun., 60:3345-59.

Plus particulièrement, l'invention porte sur des construction

20 comprenant :

- la séquence codant pour le fragment B,
- une séquence codant pour un ou plusieurs polypeptides dont l'expression est recherchée. Il peut s'agir d'épitopes dont l'expression membranaire est recherchée à la surface des cellules ; il peut s'agir
- 25 également de polypeptides permettant la rétention des protéines dans l'appareil de Golgi ; il peut s'agir enfin de polypeptides permettant de restaurer un fonctionnement perturbé du transport intracellulaire.

La construction pourra en outre comporter, toute séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide dont la présence permet un

transport intracellulaire correct dans les cellules destinées à être traitées par les molécules de l'invention. Il pourra s'agir en particulier :

- d'une séquence codant pour un signal de N-glycosylation,
- d'une séquence codant pour le signal de rétention KDEL.

5 La construction polynucléotidique de l'invention est sous le contrôle d'un promoteur, de préférence un promoteur fort permettant un taux d'expression correct dans les bactéries dans lesquelles il a été transfecté.

 L'invention a également pour objet des bactéries transfectées
10 comprenant ces constructions, et susceptibles de produire les protéines ou polypeptides chimériques de l'invention.

 Les cellules hôtes traitées par les molécules de l'invention font également partie de l'invention ; elles peuvent être tout type de cellules et notamment :

15 -celles qui peuvent être traitées *ex vivo* comme les cellules du système immunitaire actives dans le déclenchement de l'immunité cellulaire, telles les cellules dendritiques, les macrophages, ou les lymphocytes B ;

 - celles qui peuvent être traitées *in situ* comme les cellules
20 épithéliales utilisables dans la restauration de fonctions altérées soit par un déficit génétique, soit par une perturbation métabolique ;
 - des cellules cancéreuses.

 De manière générale, Les molécules chimériques de l'invention permettent d'approcher une méthode thérapeutique nouvelle qui
25 s'affranchit des problèmes liés aux vecteurs viraux ou rétroviraux habituellement utilisés pour intégrer et faire exprimer des molécules exogènes dans des cellules animales. La méthode thérapeutique, telle qu'elle découle des molécules de l'invention, consiste à traiter directement les cellules d'un patient, soit *ex vivo*, soit par application directe de type

stéréotaxique des séquences polypeptidiques chimériques, ou enfin par les méthodes classiques de traitement mucosal, comme les aérosols.

L'invention porte sur l'utilisation des polypeptides chimériques ou des séquences polynucléotidiques codant pour les polypeptides de l'invention dans la fabrication de compositions thérapeutiques, dans laquelle des polypeptides particuliers sont exprimés au niveau des membranes des cellules cibles. Ces polypeptides sont de façon avantageuse des épitopes contre lesquels le développement d'une réaction immunologique est recherchée qui sont alors présentées à la surface des cellules du système immunitaire, notamment des cellules dendritiques, des macrophages ou des lymphocytes B. Le fragment B de la toxine de Shiga agit comme un vecteur d'épitope permettant de programmer des cellules présentatrices d'antigènes.

La présente invention porte sur une méthode d'immunothérapie, consistant à augmenter l'immunité cellulaire suite à une présence d'un antigène indésirable dans un organisme, ladite méthode consistant à faire exprimer par les cellules clefs de l'immunité cellulaire, comme les cellules dendritiques et les macrophages, des épitopes particuliers. La méthode de traitement selon l'invention vise à déclencher l'immunité à médiation cellulaire et humorale en chargeant les molécules du CMH cl I ou cl II avec les épitopes d'intérêt, après restriction dans les cellules cibles. Cela conduit à une activation des cellules T cytotoxiques à l'encontre de l'antigène dont l'élimination est recherchée.

Les épitopes présentés grâce aux constructions de l'invention sont issus d'antigènes viraux, parasitaires, bactériens, ou de toute cellule, organe, ou micro-organisme dont l'élimination est recherchée, comme peuvent l'être des cellules cancéreuses ou infectées. Les épitopes peuvent également être des leurres permettant aux molécules du « soi » reconnues comme des antigènes étrangers dans des maladies auto-

immunes d'être remplacées par les épitopes de l'invention, entraînant ainsi à un ralentissement ou à la diminution de la réaction immunitaire.

Des exemples de ces épitopes sont cités ci-dessus à l'occasion de la description des séquences polypeptidiques chimériques.

5 L'invention porte également sur l'utilisation des molécules chimériques de l'invention dans la fabrication de compositions thérapeutiques, dans laquelle les polypeptides particuliers que l'on souhaite exprimer permettent la restauration du transit intracellulaire d'une protéine dont la structure altérée conduit à son piégeage dans le RE et à
10 un déficit d'expression. C'est le cas des protéines d'expression membranaire qui subissent une maturation intracellulaire, incluant des glycosylations, sulfations, repliements (folding) etc.

Un exemple particulier est celui du mutant CFTR (Δ F508) dont l'attachement à une molécule chaperonne comme la calnexine est modifié
15 suite à une modification de la protéine ; ce qui conduit à un piégeage de la molécule, cause de la mucoviscidose, et qui se traduit par une insuffisance générale des sécrétions exocrines, notamment au niveau du pancréas et des poumons.

La présente invention porte sur une méthode de traitement
20 thérapeutique de maladies dont l'origine est un défaut de sécrétion de protéines ; la méthode consiste à administrer directement les polypeptides chimériques ou à administrer dans les cellules des patients l'information génétique sous forme de plasmides porteurs de séquences exogènes codant pour un peptide ou polypeptide qui permettra la restauration de la
25 fonction cellulaire déficiente.

Cette restauration peut résulter soit de la supplémentation de la fonction déficiente par le polypeptide X, soit d'une compétition entre la protéine mutée et le polypeptide synthétisé à partir de la séquence exogène pour la liaison avec une molécule ou un récepteur spécifique de

la machinerie cellulaire. Un exemple particulier est le traitement du mutant précité, cause de la mucoviscidose, par administration d'un vecteur porteur d'une séquence codant pour le site d'attachement de la protéine CFTR avec sa molécule chaperonne, ou par administration directe du polypeptide chimérique.

Les constructions de l'invention mettent à la disposition de la communauté de la santé humaine ou animale un moyen thérapeutique nouveau pour traiter les maladies ayant pour cause un déficit du transit intracellulaire, ou pour augmenter ou induire une présentation membranaire d'une molécule, d'un polypeptide ou d'un épitope d'intérêt.

D'autres propriétés de l'invention apparaîtront à la lumière des exemples qui suivent.

I - Construction d'un polynucléotide chimérique recombinant et production du polypeptide correspondant.

I - 1) Construction du plasmide.

L'épitope X choisi est l'épitope MAGE, présent dans les cellules cancéreuses de patients atteints de mélanome. Le plasmide utilisé est le plasmide pSU108 décrit dans Su et al., 1992, Infect. Immun. 60:33-45, 3359.

Les amorces PCR utilisés sont les suivantes :

5'-ACTAGCTCTGAAAAGGATGAACTTTGAGAATTCTGACTCAGAATAGCTC-3'
5'-CTTTTCAGAGCTAGTAGAATTAGGATGATAGCGGCCGCTACGAAAA
ATAACTTCGC-3'

Ces amorces sont utilisées avec des amorces spécifiques du vecteur ShigaAtpE (5')

5'-CACTACTACGTTTTAAC-3'

5'-CGGCGCAACTATCGG-3',

afin de produire des fragments qui ont été clonés au niveau des sites de restriction SphI et Sall du plasmide SU108.

Des fragments adaptateurs contenant le site de glycosylation et la séquence KDEL, composé des oligonucléotides sulfate 1 : ((5' phosphorylated; 5'-GGCCGCCATCCTAATTCTACTTCT-3') et sulfate 2 (5'-CTCAGAAGTAGAATTAGGATGGC-3') ou de sulfate 3 (5'-GAGTCTGAAAAAGATGAACTTTGATGAG-3') ont été ligaturés pendant la nuit à 16°C.

Les fragments résultants ont été clonés dans les sites de restriction de pSU108 NotI et EcoRI et contenant le cDNA codant pour B-Glyc-KDEL.

10 1 - 2) Purification de protéines

La purification des fragments recombinants est faite également selon la technique décrite dans Su et al, 1991, cité plus haut. Brièvement, des cellules de *E. coli* contenant des plasmides d'expression recombinants obtenus à partir de pSU108 sont mis en cultures toute la nuit à 30°C. La culture a ensuite été diluée 5 fois dans du LB supplémenté avec 50 mg/ml d'ampicilline à 50°C. Après incubation pendant 4 heures à 42°C, les cellules sont lavées largement dans 10 mM Tris/HCl, pH 8, incubées pendant 10 min. dans 10 mM Tris/HCl, pH8; 25% de sucrose, 1 mM EDTA, et finalement resuspendu rapidement dans un mélange eau-glace contenant 1 mM de PMSF et un mélange d'inhibiteur de protéase (leupeptine, chymostatine, pepstatine, antipaine, et aprotinine). La dernière étape conduit à la rupture du periplasme. Après clarification, le surnageant est chargé sur une colonne QFF (Pharmacia) et élué par un gradient linéaire de NaCl dans 20 mM Tris/HCl, pH 7.5. Selon la construction, le fragment B est élué entre 120 mM et 400 mM. Les fractions contenant le fragment B sont ensuite dialysées contre 20 mM de Tris/HCl, pH 7.5, et rechargées sur une colonne monoQ (Pharmacia) et éluées de la même façon que précédemment. Les protéines résultantes, estimées à un degré de pureté de 95% par gel d'électrophorèse en polyacrylamide-SDS, sont

ensuite stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

I - 3) Induction d'une réponse CTL in vitro.

Des cellules dendritiques (CD) sont mises en culture suivant des protocoles préétablis (Romani et al., 1994). En bref, des PBMC sont
5 remises en suspension dans le milieu d'Iscove et incubées pendant 2 h à 37°C dans des boîtes à 6 puits. Les cellules qui n'ont pas adhéré sont enlevées et les cellules restantes sont incubées à 37°C en présence de GM-CSF (800 U/ml) et d'IL-4 (500 U/ml). Après 5 jours de culture, IL-1 α et IFN- γ respectivement à une concentration de 50 U/ml et 150 u/ml, sont
10 ajoutés et l'incubation est poursuivie à 30°C pendant 24 h. Les cellules dendritiques sont ensuite remises en suspension dans le milieu d'Iscove en présence de concentrations croissantes de fragment B couplé à l'épitope MAGE et en présence de la β 2-microglobuline humaine à 3 μ g/ml, ceci afin d'améliorer la capacité des cellules à la présentation des épitopes
15 membranaires. Ce mélange est incubé à 30°C pendant 4 h. Des CD qui ont internalisé le fragment B couplé à cet épitope sont irradiées à 5000 rad, assemblées par centrifugation, remises en suspension, et mélangées à des lymphocytes CD8 $^{+}$ (préparées à partir des PBMC). Ces CD pulsées avec un antigène et les CD8 $^{+}$ sont ensuite gardées en co-culture en présence
20 d'IL-7 à 5 ng/ml.

Après 10 jours, les lymphocytes CD8 $^{+}$ répondeurs sont restimulés par des CD irradiées fraîchement préparées, qui ont été elles aussi incubées en présence de concentrations croissantes de fragment B couplé à ce même épitope. La co-culture de CD et de lymphocytes CD8 $^{+}$
25 répondeurs est poursuivie en présence d'IL-2 et d'IL-7 à 10 U/ml et 5 ng/ml, respectivement. Ce protocole de restimulation est répété 3 fois.

Pour mesurer l'induction d'une réponse de CTL, les lymphocytes CD8 $^{+}$ répondeurs pré-stimulés comme décrit ci-dessus sont incubés en présence de cellules cancéreuses ou de cellules infectées par un virus.

Ces cellules qui expriment l'épitope choisi ont été marquées avec du $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ puis mises en contact avec les CD8^+ répondeurs pendant 5 h (Bakker et al., 1994). La radioactivité libérée dans le milieu est ensuite déterminée, permettant de quantifier l'activité cytotoxique des lymphocytes

5 CD8^+ répondeurs pré-stimulés.

Résultats

II - Présentation de l'antigène MAGE I par des cellules Pena-EBV et dendritiques pulsées par un fragment B de la toxine Shiga porteur de cet antigène.

10 **II - 1) Etude morphologique du transport intracellulaire d'un fragment B porteur de l'épitope MAGE-1.**

Nous avons montré qu'il est possible de fusionner une séquence peptidique à l'extrémité carboxy-terminale du fragment B de la toxine Shiga tout en préservant le routage intracellulaire de cette protéine vers le

15 réticulum endoplasmique (RE). Cette démonstration a été effectuée en construisant des polypeptides chimériques comprenant le fragment B, le site de N-glycosylation et le signal de rétention KDEL. A titre de témoin, le signal de rétention KDELGL a été utilisé qui est la version inactive du peptide KDEL, Misendock et Rothman, 1995, J. Cell. Biol, 129: 309-319.

20 Par des études morphologiques et biochimiques, il a été montré que le fragment B modifié et transporté de la membrane plasmide via des endosomes et l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique. Ce transport est inhibé par le BFA (Brefeldine A métabolite fongique) et diminué par le nocodazole (agent dépolymérisant des microtubules).

25 Ces expériences montrent clairement que le routage intracellulaire de la protéine de fusion vers le réticulum endoplasmique est préservé. Pour évaluer le potentiel du fragment B en tant que vecteur d'épitope pour la vaccination anti-tumorale *in vitro*, l'épitope MAGE-1 a été rajouté au fragment B-Glyc-KDEL dans les conditions expérimentales

décrites plus haut. La nouvelle protéine a été nommée B-MAGE-Glyc-KDEL. La protéine B-MAGE-Glyc-KDEL a été couplée au fluorophore DTAF afin de pouvoir suivre son transport intracellulaire par microscopie confocale. Après son internalisation, cette protéine est détectable au
5 niveau de l'appareil de Golgi ainsi qu'au niveau du RE des cellules HeLa, des cellules Pena-EBV (lignée de lymphocytes B immortalisées à l'aide du virus d'Epstein-Barr). Ces résultats confirment les observations originales concernant le transport intracellulaire d'un fragment B modifié à son extrémité carboxy-terminale (décrit plus haut) et permettent d'affirmer que
10 certaines cellules présentatrices de la lignée hématopoïétiques sont capable d'internaliser le fragment B et de transporter la protéine jusqu'au RE.

Nous allons maintenant préciser ces études en mesurant la N-glycosylation de la protéine B-MAGE-Glyc-KDEL. La N-glycosylation est
15 une modification qui se fait spécifiquement au niveau du RE, et nous avons montré précédemment qu'un fragment B porteur d'un site de reconnaissance pour la N-glycosylation est en fait glycosylé si elle est transportée jusqu'au RE.

II - 2) Etude de la présentation de l'antigène MAGE-1 par des
20 cellules Pena-EBV et dendritiques pulsées par la protéine B-MAGE-Glyc-KDEL.

Afin d'évaluer la capacité du fragment d'agir en tant que vecteur d'épitope, nous nous sommes servi d'un clone de lymphocytes T cytotoxiques (CTL 82/30) reconnaissant spécifiquement l'épitope MAGE-1
25 associé au CMH de classe I de cellules présentatrices du haplotype HLA-A1. Ces CTL sont gardées en présence de cellules Pena-EBV ou dendritiques pulsées avec la protéine B-MAGE-Glyc-KDEL. Si l'épitope MAGE-1 est présenté par des cellules présentatrices, les CTL seront activées et sécréteront le l'interféron γ (IFN γ), qui est ensuite dosé.

La quantité d'INF γ sécrétée est proportionnelle à l'amplitude de la stimulation des CTL par des cellules présentatrices.

Des cellules présentatrices (Pena-EBV et dendritiques), 20000 cellules par micropuits à fonds ronds) ont été soit fixées 1 h avec du PBS-paragromaldéhyde 4%, soit non fixées. Elles ont ensuite été lavées 2 fois avec de l'OptiMEM avant d'être incubées pour 15 h avec des dilutions de la protéine B-MAGE-Glyc-KDEL. La protéine a été testée à 4 dilutions, en commençant à une concentration de 10 μ M final, et diluant de 5 en 5 dans du milieu OptiMEM (milieu sans sérum). Après 15 h, les plaques ont été lavées 2 fois par centrifugation à basse vitesse. Les CTL (CTL 82/30) ont été rajoutées à raison de 5000 CTL par puits dans 100 μ l de milieu de culture (ID-HS-AAG + 25 U/ml d'IL2). Comme contrôle positif, des CTL 82/30 ont été gardées en présence de la lignée G43 (lignée de lymphocytes B transfectées par un plasmide d'expression de MAGE-1). Après 24 h d'incubation, les surnageants ont été récoltés pour doser la quantité d'INF γ produit.

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau I.

Tableau I

Type de cellules		Concentration de B-MAGE-Glyc-KDEL			
		10 μ M	2 μ M	0.4 μ M	0.08 μ M
Dendritiques					
	fixées	446 \pm 293	821 \pm 64	661 \pm 18	312 \pm 181
	non fixées	1557 \pm 404	1315 \pm 91	1231 \pm 150	1174 \pm 478
Pena-EBV					
	fixées	70 \pm 47	68 \pm 48	23 \pm 32	4 \pm 5
	non fixées	1966 \pm 415	1960 \pm 206	1544 \pm 42	853 \pm 116

Les résultats sont représentés par unité d'INF γ produit dans

chaque conditions (moyenne \pm écart type; n = 3).

Nous constatons que les cellules dendritiques et les cellules Pena-EBV pulsées avec la protéine B-MAGE-Glyc-KDEL sont bien reconnues par les CTL, même à de faibles concentrations de la protéine.

- 5 Par contre, les cellules dendritiques et les cellules Pena-EBV, qui ont été fixées préalablement, ne sont pas reconnues. Il semble donc qu'il y ait eu endocytose et processing de la protéine B-MAGE-Glyc-KDEL. Ces résultats encourageants seront maintenant étayés par des expériences de vaccination *in vitro*.

10 III - Test d'activité anti-tumorale et/ou antivirale *in vivo* chez la souris.

- Les cellules dendritiques de souris sont préparées et marquées avec un antigène dérivé des protéines P21RAS, P53 ou EP2/NER pour tester l'activité anti-tumorale ou de HBV, EBV ou HPV pour tester l'activité
15 antivirale. Cette préparation de cellules dendritiques est effectuée selon le protocole présenté en I- 4) ci-dessus.

Ces cellules dendritique sont ensuite introduites chez la souris.

- L'effet antiviral ou anti-tumoral est observé par traitement ultérieur de ces souris ainsi greffées par des cellules tumorales ou des
20 virus exprimant cet antigène.

Conclusion

- Les séquences polypeptidiques ou les séquence polynucléotidiques de l'invention peuvent ainsi avantageusement constituer un principe actif d'une composition pharmaceutique destinée à traiter
25 certains cancers ou certaines infections virales ou bactériennes, à partir du moment où un épitope particulier dudit virus ou de ladite cellule cancéreuse aura été intégrée dans la séquence nucléotidique recombinante, conduisant à une synthèse d'un polypeptide chimérique susceptible d'être restreint par le CMH classe 1 et d'être exprimé en surface membranaire

des cellules du système immunitaire.

IV :- Restauration du transport intracellulaire de la protéine mutée CFTR ($\Delta F508$) à l'aide du fragment B de la toxine de Shiga.

La protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) est
5 un canal chlore de la membrane plasmique. Chez la grande majorité des patients atteints de mucoviscidose, le gène CFTR porte des mutations. La mutation ($\Delta F508$), la plus fréquente observée, affecte le routage intracellulaire de la protéine CFTR. En effet, la protéine mutée CFTR($\Delta F508$), qui est fonctionnelle en ce qui concerne son activité canal
10 ionique, reste bloquée au niveau du réticulum endoplasmique, au lieu d'être transportée jusqu'à la membrane plasmique. Nous avons introduit dans le réticulum endoplasmique à l'aide du fragment B de la toxine de Shiga, un domaine de la protéine CFTR connu pour être le domaine d'interaction avec la protéine calnexine ("chaperonne" du RE). Ce domaine
15 sera fusionné à l'extrémité carboxy-terminale du fragment B. Nous avons testé que cette protéine chimérique permet de déplacer les chaînes N-glycosylées de la glycoprotéine CFTR ($\Delta F508$) du site d'interaction avec la calnexine, ce qui a pour effet que la protéine CFTR ($\Delta F508$) n'est plus retenue dans le réticulum endoplasmique et peut être transportée jusqu'à
20 la membrane plasmique et fonctionner alors normalement.

Dans un premier temps, nous avons construit une protéine chimérique composée du fragment B et du domaine d'interaction dérivé de la protéine CFTR. Un signal de recyclage (le peptide KDEL) a été ajouté à l'extrémité carboxy-terminale de cette protéine afin d'augmenter sa
25 rétention dans le réticulum endoplasmique. Il a été tout d'abord vérifié que la nouvelle protéine était elle aussi transportée dans le réticulum endoplasmique des cellules cibles. La mobilisation de CFTR ($\Delta F508$) a été étudiée dans des cellules d'une lignée stable de cellules LLCPK1 transfectées par l'ADNc de CFTR ($\Delta F508$). Cette lignée a été établie par

Mlle. M. A. Costa de Beauregard et M. D. Louvard (Institut Curie, Paris, CNRS UMR 144). La protéine CFTR ($\Delta F508$) qui est exprimée dans ces cellules a été de plus dotée d'un épitope tag. Il est donc possible de détecter par immunofluorescence l'arrivée de la protéine CFTR ($\Delta F508$) au sein de la membrane plasmique. En l'absence de traitement, la membrane plasmique des cellules LLCPK1 de la lignée est dépourvue de marquage spécifique de CFTR ($\Delta F508$) au sein de la membrane plasmique. Si les résultats de ces expériences pilotes sont prometteurs, nous nous efforcerons de développer cette approche dans une optique de thérapie de la mucoviscidose.

Conclusion

L'expérience décrite ci-dessus montre que le polypeptide synthétique dans lequel X est constitué du domaine d'interaction entre la protéine CFTR et la calnexine peuvent avantageusement constituer le principe actif d'une composition thérapeutique destiné à traiter la mucoviscidose. En effet, la compétition entre le domaine d'interaction muté existant chez le mutant et le fragment du polypeptide synthétique pour l'interaction avec la calnexine peut permettre de restaurer la sécrétion au niveau des bronches de la protéine mutée.

REVENDECATIONS

1 - Séquence chimérique comprenant le fragment B de la toxine de Shiga ou un équivalent fonctionnel de celui-ci liée avec un ou plusieurs polypeptides répondant à la formule B - X, dans laquelle B représente le fragment B, X représente un ou plusieurs polypeptides dont la longueur totale a comme limite supérieure celle de la compatibilité avec un transport rétrograde.

2 - Séquence selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre :

- un site de glycosylation, ou
- un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique, ou
- un site de sulfatation, ou
- un mélange de ceux-ci.

3 - Séquence chimérique comprenant le fragment B de la toxine de Shiga ou un équivalent fonctionnel de celui-ci liée avec un ou plusieurs polynucléotides X' porteurs d'une séquence codant pour un polypeptide X dont l'expression est recherchée.

4 - Séquence selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que X est un épitope susceptible d'être présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

5 - Séquence selon la revendication 4 caractérisée en ce que X est un épitope issu d'un polypeptide ou d'une protéine dont l'expression à la surface de cellules du système immunitaire est recherchée et notamment dans le groupe formé de protéines de cellules cancéreuses, de protéines de virus, d'oncogènes.

6 - Séquence selon la revendication 5 caractérisée en ce que X est un épitope MAGE spécifique de cellules de mélanome.

7 - Séquence selon la revendication 5 caractérisée en ce que X est un polypeptide susceptible de restaurer ou d'activer une fonction du transport rétrograde dans la cellule permettant l'expression d'une protéine à la surface des cellules .

5 8 - Séquence selon la revendication 7 caractérisée en ce que X est le domaine d'interaction entre la protéine CFTR et une molécule chaperonne.

9 - Utilisation d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 8 pour la présentation antigénique d'épitopes sur des cellules du système
10 immunitaire.

10 - Utilisation selon la revendication 9 caractérisée en ce que les cellules sont des cellules dendritiques ou des macrophages.

11 - Utilisation selon la revendication 9 ou 10 caractérisée en ce que les épitopes sont issus d'antigènes viraux, parasitaires ou bactériens,
15 ou dérivés de protéines spécifiques de cellules cancéreuses, dérivés d'oncogènes ou dérivés de protéines de virus cancérogènes.

12 - Utilisation d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 3 comme principe actif pour la restauration du transit intracellulaire de protéines mutées dans leur site d'attachement à une molécule chaperonne.

20 13 - Utilisation selon la revendication 12 dans laquelle la protéine mutée est la protéine CFTR responsable de la mucoviscidose.

14 - Composition à visée thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme principe actif une séquence selon l'une des revendications 1 à 8.

25 15 - Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que la séquence est une séquence polypeptidique selon la revendication 1.

16 - Utilisation d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 à la fabrication d'un médicament permettant de restaurer des déficits du transport intracellulaire.

17 - Utilisation d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour la fabrication d'un médicament permettant de stimuler les défenses immunitaires de l'organisme vis-à-vis d'infections virales, parasitaires, bactériennes, ou d'antigènes cancéreuses.

- 5 18 - Utilisation d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour la fabrication d'un médicament permettant de diminuer ou supprimer des réactions immunitaires dans les maladies auto-immunes.

INSTITUT NATIONAL

de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 544860
FR 9709185

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP 0 439 954 A (SERAGEN INC.) 7 août 1991 * le document en entier *	1,3-5,7, 9-18
X	WO 97 13410 A (BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION) 17 avril 1997 * le document en entier *	1,3-5,7, 9-18
X	WO 93 17115 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH) 2 septembre 1993 * le document en entier *	1,3-5,7, 9-18
X	WO 93 16186 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH) 19 août 1993 * le document en entier *	1,3-5,7, 9-18
X	A RAPAK ET AL.: "Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to the cytosol" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 94, avril 1997, WASHINGTON US, pages 3783-3788, XP002061694 * le document en entier *	1,3-5,7, 9-18
X	L JOHANNES & B GOUD: "Shiga toxin as a tool to study retrograde transport" ANNUAL MEETING OF THE 6TH INTERNATIONAL CONGRESS ON CELL BIOLOGY AND THE 36TH AMERICAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY, SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA, DECEMBER 7-11, 1996. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL , vol. 7, no. suppl., 1996, page 75a XP002061695 * le document en entier *	1-18
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N C07K A61K
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 avril 1998		Masturzo, P
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.02 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 544860
FR 9709185

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
T	L JOHANNES ET AL.: "Retrograde transport of KDLE-bearing B-fragment of Shiga toxin" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 272, no. 31, 1 août 1997, MD US, pages 19554-19561, XP002061696 * le document en entier * -----	1-18
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 avril 1998		Masturzo, P
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou amorce-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 150 10 92 (P04C13)